云 南 植 物 研 究 1992; 14 (1): 73—79
Acta Botanica Yunnanica

建水无籽蜜桔的幼胚培养和无性系苗的繁殖*

黄仕周 熊德华
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要 以建水无籽蜜桔（*Citrus reticulate*）开花后 120 天的幼胚为材料。在含 BA0.5mg／l（单位以下同）或 IBA0.5 或 BA0.2+2,4—D1.5 的 MT（*Murashige and Tueker*）培养基中，可使幼胚发育成丛芽和不同类型的胚状体。IBA0.5—1.0 有益于球形胚、子叶胚的增殖，BA0.5 有益于子叶胚形成丛芽。小芽段在附加 BA0.5 的 MT 培养基中增殖率相对较高，其速度 65 天为 3.2 倍，112 天为 4.2 倍，142 天为 5.2 倍。芽苗在 1／2MT+IBA（或 NAA）0.5—1.0 中的平均生根率为 90%，接种后置于光下培养比先暗后光处理的生根率要高 37.8%；嫩芽苗比老芽苗的生根率高 15.4%，且出根早、根数多。移苗的平均成活率为 92.2%；移后 8 个月的苗高达 40cm 以上。

关键词 建水无籽蜜桔；幼胚培养；无性系繁殖

JUVENIL EMBRYO CULTURE AND PLANTLET CLONAL PROPAGATION OF THE JIANSHUI SEEDLESS TANGERINE ORANGE (CITRUS RETICULATE) IN VITRO

HUANG Shi-Zhou, XIONG De-Hua
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*, Kunming 650204)

Abstract The juvenile embryos of *Citrus reticulate* Blanto after blossom 120 days were used as experiment material. The tufted shoots and all kinds of embryoid can be induced on MT medium with BA 0.5mg／l or IBA 0.5mg／l or BA 0.2mg／l +2, 4-D 1.5mg／l. The multiplication and growth of globularity embryoid and seed-leaf embryoid were nice in medium with IBA 0.5-1.0mg／l, BA 0.5mg／l was very satisfied with forming tufted shoots from seed-leaf embryo. The shoots can multiply in MT medium with BA 0.25-1.0mg／l; multiplication rate was the hightest in MT with BA 0.5mg／l and the proliferation speed of the shoots was 3.2 times in 65 days, 4.2 times in 112 days, 5.2 times in 142 days. The percentage of average rooting reached about 90% for shoots in 1／2 MT medium with IBA (or NAA) 0.5-1.0mg／l. The rooting rate of shoots in the light were 38.7% more than in the dark first then in the light, with rooting early and more number of roots. Rooting rate of young shoots were 15.4% more than old shoots. Average survival

1990年12月收稿，1991年1月定稿。
* 云南省科委基金资助项目。

rate of transplant were 92.2%. After the 8 months transplanted the plantlet length was over 40 cm.

Key words *Citrus reticulate;* Juvenil embryo culture; Clonal propagation

建水无籽优良蜜桔(*Citrus reticulate* Blanto)系云南省建水县科委依靠群众从20多万株建水白桔的实生成年树中筛选而成的。它的果型扁平，个体适中，皮薄，酸甜适口，渣少，籽少（单果平均含籽1.5—2.2粒），且不饱满，贮藏性好，外果皮表面有10条左右的轮状突起，其上有丘状突起点，外形与一般白桔相异，它属于㭎柑类型的多胚性品种。仅有一株母树。为保存本品种的种质资源和发展生产，我们进行了幼胚培养和快速繁殖试验。本文报道它的离体繁殖成苗技术。

材料和方法

材料与灭菌 从建水无籽优良蜜桔成年树上取开花后120天的幼果，用75%酒精擦洗或浸泡幼果数分钟，用无菌水冲洗干净后在无菌条件下剥去内、外果皮，从果瓣中取出种子，剖其胚作为培养材料。取胚种芽苗上的顶芽和侧芽切段或胚状体苗进行植株的快速繁殖。单籽幼胚编号为A3、A4、A5、A17。

幼胚培养基 A.MT为基本培养基，蔗糖改为4%，附加水解酪蛋白（CH）500mg／1（单位以下同）、BA0.5、IBA0.1；B.附加IBA0.5—1.0；C.附加抗败血酸5，核黄素、生物素各0.1，CH400，BA0.2培养100天后转入2.4—D1.5+BA0.2的培养基中。

芽增殖培养基 MT+CH400+抗败血酸5+核黄素、生物素各0.1+蔗糖4%+不同浓度的BA（详见结果部分）。

生根培养基 1／2MT附加不同浓度的IBA、NAA或它们的配组。

培养室温度为23—27℃，每日荧光灯40W1—2盏照光12小时。

结　　果

幼胚培养 接种后经4—5个月幼胚在培养基A中发育成无根芽苗（图1：7）；B中出现有根芽丛；C中看到了芽苗、芽丛和不同类型的胚状体（图1：1—6）。即上述BA和IBA组配的A培养基能促进胚芽分化，抑制根的分化，幼胚直接发育成无根苗；在含IBA的B培养基中，幼胚长成完整植株；在BA和2，4—D的C培养基中，可导至幼胚发生愈伤组织和胚状体，也可直接发育成无根苗。IBA0.5—1.0mg／1能促进球形胚、子叶胚的形成和增殖，BA能促进子叶胚长芽。

芽增殖 从幼胚获得的芽苗和胚状体苗按芽段切割后培养在含BA的培养基中，发现BA不同浓度（0.25—1.0）对芽的增殖有明显影响，以BA0.5的增殖率最高，培养65天后的增殖倍数为3.2倍，112天后为4.2倍，142天后为5.2倍（表1）。无菌芽条上不同部位的芽切段的增殖率也很不同，顶端部分的增殖率明显低于基部和中部的增殖率，前者低于后者1.5倍（表2）。

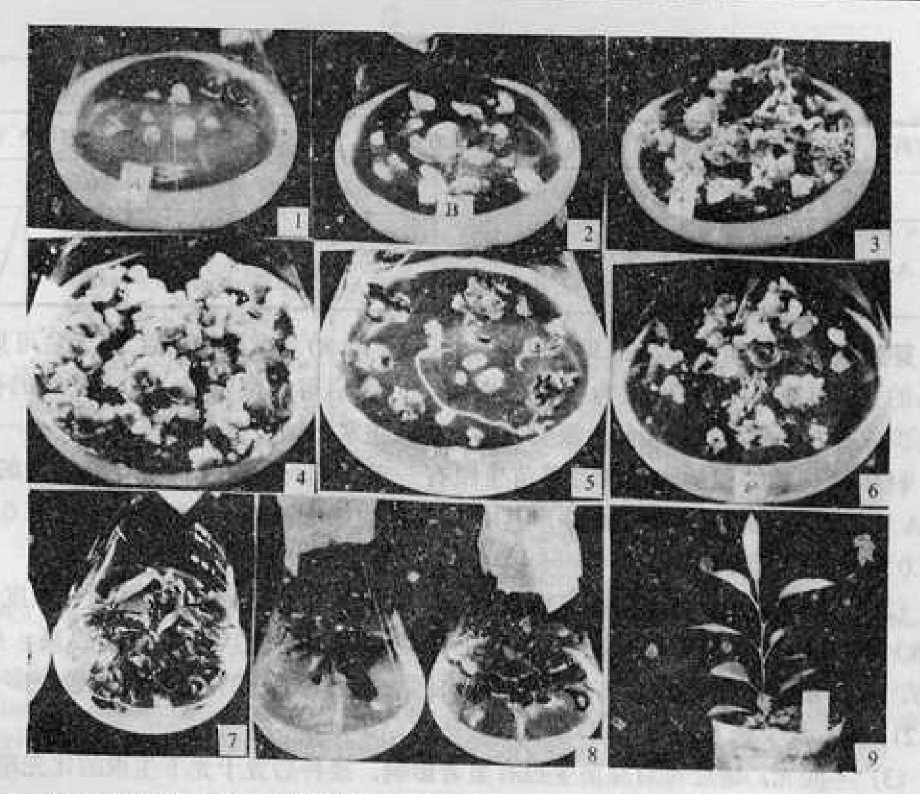


图1. 1. 球形胚状体；2. 鱼雷—心形胚状体；3. 子叶胚状体；4. 各种类型胚状体；5. 胚状体生根；6. 胚状体苗；7. 丛芽；8. 芽条生根；9. 移栽成活苗.

Fig1. 1. globularity embryoids; 2. terpedo-beart embryoids; 3. seed-leaf embryoids; 4. embryoid of different kind; 5. embryoid rooting; 6. embryiod plantlet; 7. tufted shoots; 8. rooting of shoot; 9. survival plantlet.

表 1. 不同浓度 BA 对芽增殖的影响*

Table 1. The effect of BA concertration on multiplication of buds

材料号	BA 浓度 (mg/l)	接种芽段数	形成丛芽数			芽增殖率(%)		
			65(d)	112(d)	142(d)	65(d)	112(d)	142(d)
A_3	0.25	58	147	190	234	253.4	327.4	403.3
	0.50	60	174	209	314	290.0	348.3	523.3
	1.00	63	175	210	281	277.8	333.3	446.0
A_4	0.25	35	83	88	109	237.1	251.4	311.4
	0.50	31	117	157	165	377.4	506.5	532.2
	1.00	38	116	146	168	305.3	384.2	442.1
A_5	0.25	36	97	–	–	269.4	–	–
	0.50	34	105	–	–	308.8	–	–
	1.00	30	85	–	–	238.3	–	–

*培养基(Medium): MT+CH400mg/l GA$_3$ 0.25mg/l, Sucroso 4%+Agar 4.5g/l.

表 2. 不同部位芽的增殖率比较

Table 2. Comparisons of buds multiplication rate of differet shoots

材料号	部 位	接种芽数	形成的芽数		为接种芽的百分数		芽增殖率 (%)	
			46(d)	87(d)	46(d)	87(d)	46(d)	87(d)
A_3	顶 部	150	217	311	144.7	207.3	44.7	107.3
	中 部	70	200	241	285.7	344.3	185.7	244.3

芽生根 当芽苗高约3cm即可切下生根（图1：8）。生根处理后10天后可见10—20%的芽条生根，20—25天为生根高峰期，30天后可结束生根。50—60%的苗为独根，少数有3条根。根系粗壮，根尖白色，生长正常。试验中看到：

(1) 生长素的种类和浓度对芽苗生根有一定影响。0.5—1.0m／l范围内的IBA、NAA均能获得82—93%的生根率，其中IBA的生根率比NAA稍高，浓度为0.5的又比1.0的要高些（表3）。

(2) 不同质地的芽条其生根有明显差异，嫩芽苗（生长3个月，木质化程度低，茎脆嫩）比老芽苗（生长8个月，木质化程度较高，茎硬）的生根率要高，前者为98%，且出根早，每苗具2—3条根的苗比例大，后者为82%，出根较慢，多为独根(图2)。

(3) 不同光、暗处理对芽苗生根有显著影响。接种后置于光下生根的比先暗培养9天后再转入光下培养的其生根率要高得多，前者为90%，且出根快，后者权47—50%，且愈伤组织增生明显（图3)。

表 3. 不同生长素对芽条生根率的影响

Table 3. The effect of different kind and concertration auxin on the rooting rate of shoots

材料号	生长素		供试芽条数	生根芽条数	生根率 (%)
	种 类	浓 度 (mg／l)			
A_3	NAA	0.5 1.0	98 100	86 82	87.8 82.0
A_3	IBA	0.5 1.0	48 48	45 44	93.8 91.7
A_5	IBA	0.5 1.0	41 46	38 38	92.7 82.6
A_4	NAA +IBA	0.25 0.25	48	43	89.6
	+NAA IBA	0.5 0.5	48	45	93.8
A_{17}	IBA	0.5	34	31	91.2

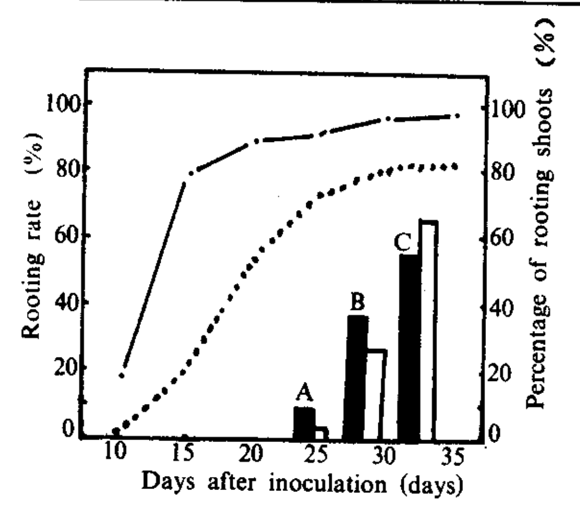


图 2. 不同质地芽苗的生根比较

·——·　嫩芽苗 Young shoots.

·……·　老芽苗 Old shoots.

A. 每苗具 3 条根；B. 每苗具 2 条根；

C. 每苗 1 条根.

Fig.2 Comparison of rooting in different shoots. (tested number of shoots: 52; medium: 1/2MT+CH200mg/1+ sucrose 2% with IBA (or NAA) 0.25—0.5mg/1.)

A: every shoot had 3 roots; B: every shoot had 2 roots; C: every shoot had 1 root.

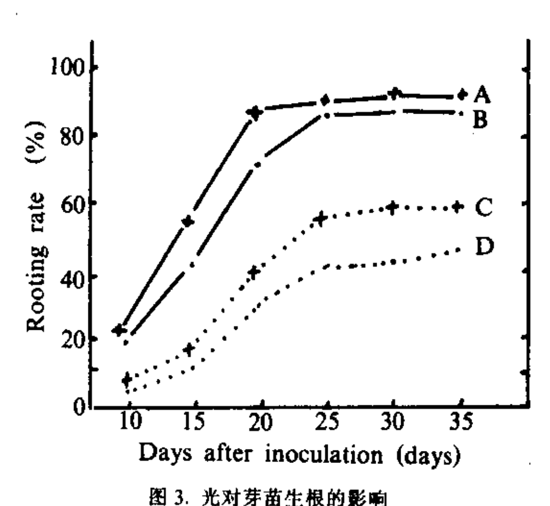


图 3. 光对芽苗生根的影响

Fig.3 The effect of light and dark on the rooting of shoots.

+——+　·——·　接种后置于光下(cultured in light after inoculation); +……+　·……·　接种后全黑暗培养 9 天，然后转入光下(cultured in the dark for 9 days, after inoculation then were transfered in light).

A、C: IBA 0.25mg/1+NAA 0.25mg/1;

B、D: IBA 0.5mg/1+NAA 0.5mg/1.

苗移栽　待根系有 1—2cm 长就可栽入腐叶土：壤土为 1：1 的基质中（若生根后嫌茎不够高，也可不移，待茎长高后再移），移后浇水，用薄膜塑料套袋保湿即可成活。全年多次移苗的平均成活率可达 92.2%。在昆明地区的自然温室中，不同季节对移栽成活率没有多大影响（表 4）。栽后 4 个月，幼苗生长缓慢，苗高仅 5—8cm，其后生长加快，8 个月后可达 40cm，个别可达 76cm。

繁殖力　表 1 和多次试验统计的结果表明，它的平均繁殖系数为 3，一年内的繁殖次数为 4。

讨　论

柑桔的胚培养已有报道，不少研究者指出，多胚性柑桔的杂交种子，不仅直播田间很难获得杂种苗，即使是成熟种子人工培养也由于部分种子的受精胚败育，杂种苗也很少。Frost [1] 认为一些多胚性强的柑桔品种为母本的杂交实生苗中，受精胚几乎完全不能成苗。据统计丹西（Dancy）红桔和卡拉（Kara）桔为母本的杂交苗中，百分之百是珠心苗，椪柑和粗柠檬的实生苗中，珠心苗占 98%；王大元等 [2] 通过小胚的人工培养证明，锦橙×枳（*Citrus sinensis*× *Poncirus trifoliata*）的成熟种子中，珠心苗占

93%；Navarro 等[3]用四个脐橙品系的胚珠进行早期离体培养，获得了脱去多种病毒的珠心植株；高峰等[4]用 8 周龄的华盛顿脐橙（*Citrus sinensis osbeck*）未受精胚珠离体培养，获得了无病毒珠心苗。这些结果一方面说明获得柑桔的合子胚成苗实属不易，是育种工作的一大障碍，另一方面珠心苗很容易得到，利用此点可进行柑桔无性纯系的繁殖。在我们的试验中，取样周围仅有零星白桔，又非人工授粉，接种的幼胚是连同珠心组织一起接种的，可能是珠心组织而来的珠心苗。由此繁殖的无性系应具有母树的遗传特性。这些无性系苗由于来自幼胚，未渡越童期，进入开花结果期比成年树的无性系苗要长。但母树仅有一株，又在成年柑桔树的茎尖未培养成功之前利用幼胚培养，并进行无性系的繁殖，在保存优良种质资源、获得无病毒苗、在一定限度内用于生产、为研究幼胚无性系的遗传变异提供试验材料等方面，仍然是有价值的。至于该无性系在多大程度能保持母树的遗传特性，童期有多长，尚待定植后进一步观察。

表 4. 不同时期的移苗成活率

Table 4. Survival rate of transplanting seedlings in different time of a year

移栽日期	材料号	移苗数	成活数	成活率 (%)
90. 2. 14	A_3	61	58	95.1
	A_4	11	11	100.0
	A_5	8	8	100.0
90. 6. 26	A_3	117	106	90.6
	A_4	41	38	92.7
	A_5	31	29	93.5
90. 8. 29	A_3	42	35	83.3
	A_4	18	18	100.0
	A_5	19	18	94.7
合　计	A_3	220	199	90.5
	A_4	70	67	95.7
	A_5	58	55	94.8
		348	321	92.2

在我们的试验中，试管苗的年繁殖力为 3^4。在一定时期内进行多代繁殖，其繁殖速度仍然可观。生产实践中是按边繁殖边生产试管苗边移栽三者交互的模式进行的。若按理论值的 50%计，这种交互繁苗程序一个外植体经 5 年 20 代的繁殖，可得 1 亿多苗。

致谢　本工作得到云南省科委的资助；建水县科委提供试验材料；易永生同志帮助照相。

参考文献

〔1〕 Frost H B, Soost R K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: Reuther W. et al. Eds. *The citrus Industry 1968;* **2**: 290—324

〔2〕 王大元，张进仁. 柑桔胚的人工培养.植物学报 1975; **17**(2): 149—152

〔3〕 Navarro L, Juarez J, Ballester J F. et al. Obtaining nucellar virus free plants of different citrus cultivars of the navel group by means of ovule culture in vitro. *Horticul Abs* 1981; **51**: 67

〔4〕 高峰，陈杰忠，陈善春等. 柑桔未受精胚珠离体培养获得无病毒珠心苗. 植物学报 1990; **32**(7): 505—509